

培養ヒト臍帯静脈内皮細胞におけるサイトカイン誘導 プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター・ タイプ1発現に及ぼすトログリタゾンの抑制効果

金沢大学医学部医学科内科学第一講座 (主任: 小林健一教授)

野 原 え り か

インスリン抵抗性改善薬であるトログリタゾンは耐糖能異常, インスリン抵抗性, および脂質異常を改善することから, 動脈硬化の形成, 進展を間接的に抑制しうることが想定される. 一方, プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター・タイプ1 (plasminogen activator inhibitor type 1, PAI-1) は動脈硬化の病因において重要な役割を担い, インスリン抵抗性患者においてもその血中レベルの上昇が報告されている. 酸化ストレス下での単球細胞やマクロファージから放出される腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) やインターロイキン (interleukin, IL) 1 β といった様々な炎症性サイトカインによって, 血管内皮細胞におけるPAI-1の産生は刺激される. 今回, 著者は培養ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 由来のPAI-1産生に対するトログリタゾンの直接効果を検討した. HUVECは1, 10, 100 ng/ml TNF- α または0.1, 1, 10 ng/ml IL-1 β 存在下で, 1または10 μ M トログリタゾン存在下, 非存在下の0.4%血清を含む培地で24時間培養し, 培地中のPAI-1濃度をELISAキットにて測定した. 100 ng/mlのTNF- α と10 ng/mlのIL-1 β 添加によって各々のPAI-1濃度は培養開始24時間後に非添加群の 1.99 ± 0.16 倍 ($p < 0.05$), 2.42 ± 0.42 倍 ($p < 0.005$)に増加した. 10 μ Mのトログリタゾンは1 ng/ml TNF- α 刺激によるPAI-1を $34.3 \pm 4.2\%$ ($p < 0.001$), 10 ng/ml TNF- α 刺激下では $29.9 \pm 2.2\%$ ($p < 0.001$), 100 ng/mlのTNF- α 刺激下では $41.3 \pm 5.0\%$ ($p < 0.005$)に抑制した. 同様に10 μ Mのトログリタゾンは0.1 ng/ml IL-1 β 刺激によるPAI-1を $32.7 \pm 0.0\%$ ($p < 0.01$), 1 ng/ml IL-1 β 刺激下では $33.5 \pm 0.3\%$ ($p < 0.005$), 10 ng/ml IL-1 β 刺激下では $40.8 \pm 1.6\%$ ($p < 0.005$)に抑制した. ノザン・プロット解析ではトログリタゾンはTNF- α , IL-1 β により増加したPAI-1 mRNA発現を抑制した. また, トログリタゾン除去後のPAI-1産生の可逆性, およびトログリタゾン添加がHUVECにおける糖取り込みに影響を与えなかったことから, トログリタゾンによる細胞毒性はないと考えられた. 以上の結果からトログリタゾンはHUVEC由来のPAI-1産生を直接抑制することによって動脈硬化の形成と進展を抑止しうることが示唆された.

Key words plasminogen activator inhibitor type 1, troglitazone, endothelial cells, atherosclerosis

動脈硬化は酸化ストレスによる血管内皮細胞障害と変性¹⁾, および血管壁へのマクロファージや単球細胞の浸潤と血管平滑筋細胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) の遊走と増殖による血管内膜肥厚²⁾³⁾を特徴とする慢性炎症性変化と考えられている. 血管内皮細胞はグリコサミノグリカン, トロンボモジュリン, プロスタサイクリン, 組織型プラスミノゲン・アクチベーター (tissue-type plasminogen activator) といった抗血栓因子と, プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター・タイプ1 (plasminogen activator inhibitor type 1, PAI-1), 組織因子といった血栓因子の両者を発現し, その均衡によって血液凝固を調節している⁴⁾. しかし, 動脈硬化形成過程においては, こ

の内皮細胞の血液凝固調節機構の不均衡が生じていると考えられている. すなわち, 酸化ストレス下では単球細胞やマクロファージから放出される腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) やインターロイキン (interleukin, IL) 1 β , トランスフォーミング成長因子 β (transforming growth factor β , TGF- β) といった様々な炎症性サイトカインによって内皮細胞由来のPAI-1に代表される血栓因子の放出が促進され, 血栓傾向に傾くことが知られている⁵⁾. 実際, 臨床的にも, 血栓性疾患, 冠動脈疾患⁶⁾, 2型糖尿病や高インスリン血症患者⁷⁾⁸⁾において血漿PAI-1濃度の上昇が報告され, PAI-1は動脈硬化の危険因子の一つと考えられている.

平成11年7月19日受付, 平成11年8月23日受理

Abbreviations : AP-1, activator promoter - 1; FBS, fetal bovine serum; GLUT, glucose transporter; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; IL, interleukin; KRB, Krebs-Ringer bicarbonate; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; NF- κ B, nuclear factor-kappa B; PAI-1, plasminogen activator inhibitor type 1; PKC, protein kinase C; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; PPAR- γ , peroxisome proliferator-activated receptor- γ ; TGF- β , transforming growth factor β ; TNF- α , tumor necrosis factor α ; VSMC, vascular smooth muscle cell

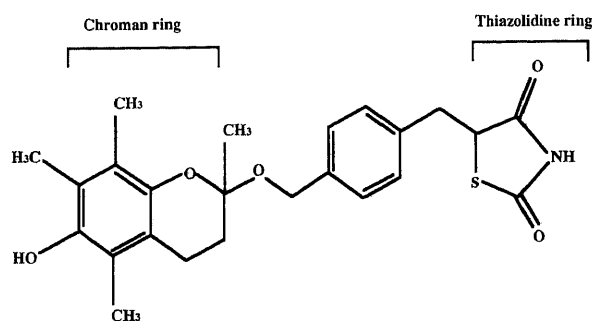


Fig. 1. The structure of troglitazone.

一方、インスリン抵抗性改善薬であるトログリタゾン、血糖降下作用を持つチアゾリジン環と、抗酸化作用を有するビタミンE類似のクロマン環より構成され(図1)、耐糖能異常、インスリン抵抗性、および脂質異常を改善する⁹⁾¹⁰⁾ことから、動脈硬化の形成、進展を間接的に抑制しうることが想定されている。一方、動脈硬化に対するトログリタゾンの直接効果に関しては、VSMCの増殖と遊走が同剤によって抑制されたことが報告されている¹¹⁾¹²⁾。また、最近、Yokoyamaら¹³⁾はヒトメサングウム細胞、および内皮細胞における単球走化性因子1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1)の発現をトログリタゾンが抑制し、動脈硬化に対して直接抑制効果を有する可能性があることを報告した。そこで、今回、ヒト臍帯静脈内皮細胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)を用いて、血管内皮細胞由来の動脈硬化危険因子の一つであるPAI-1産生に及ぼすトログリタゾンの直接効果について検討した。

材料および方法

I. 細胞培養

4から6継代のHUVEC(三光純薬、東京)を使用した。ヒトフィブロネクチン(Upstate Biotechnology, Lake placid, USA)を塗布した12穴プラスチック培養プレート(Costar, Cambridge, USA)に1穴あたり 2.0×10^4 個のHUVECを播種し、37℃、5%CO₂インキュベーター内でコンフルエントに達するまで、2.0%牛胎児血清(fetal bovine serum, FBS)、12 μg/ml ウシ脳抽出物、10 ng/ml ヒト表皮成長因子、1 μg/ml ハイドロコルチゾン、50 μg/ml ゲンタマイシン、50 ng/ml アンホテリシンBを含んだ血管内皮細胞基礎培地(三光純薬)で培養した。

II. サイトカイン刺激によるHUVECからのPAI-1産生

HUVECはサイトカインを添加する24時間前より0.4% FBSと抗生物質のみを含む血管内皮細胞基礎培地で培養した。HUVECは組換え型TNF-α(1, 10, 100 ng/ml, ENDOGEN, Woburn, USA)、または組換え型IL-1β(0.1, 1, 10 ng/ml, R&D system, Minneapolis, USA)存在下、非存在下にて0.4% FBSを含む血管内皮細胞基礎培地にて24時間まで培養し、各穴の細胞上清を培養開始6, 12, 24時間後に採取し、-20℃で凍結保存した。

III. サイトカイン誘導PAI-1産生に対するトログリタゾンの効果

HUVECはサイトカインと試薬を添加する24時間前より0.4% FBSと抗生物質のみを含む血管内皮細胞基礎培地で培養した。HUVECは組換え型TNF-α(1, 10, 100 ng/ml)、または組換え型

IL-1β(0.1, 1, 10 ng/ml)存在下、非存在下にて0.4% FBSと、1または10 μMのトログリタゾン(三共、東京)を含む血管内皮細胞基礎培地にて24時間まで培養し、各穴の細胞上清を培養開始24時間後に採取し、-20℃で凍結保存した。

IV. トログリタゾンのHUVECに対する細胞毒性の検討

12穴プラスチック培養プレートに1穴あたり 2.0×10^4 個の細胞数で播種し、コンフルエントに達したHUVECをPBSで3回洗浄後、0.025%トリプシン/EDTA溶液(三光純薬)を用いて、細胞をプレートから剥離させた。トリパン・ブルーを含む細胞浮遊液を作成し、血球計算板を用いて、生細胞数を算定した。

V. トログリタゾン除去後のPAI-1産生の可逆性に関する検討

トログリタゾン除去後のPAI-1産生の可逆性を検討するため、コンフルエントに達したHUVECを10 μMのトログリタゾンと100 ng/mlのTNF-αを含む血管内皮細胞基礎培地で24時間培養した後、細胞上清を採取し、PBSにて細胞表面を3回洗浄後、100 ng/ml TNF-α単独存在下でさらに培養を48時間継続した。24時間ごとの細胞上清を採取し、-20℃で凍結保存した。

VI. PAI-1濃度測定

HUVEC培養上清のPAI-1濃度を二重抗体法を用いたELISAキット(TintElize PAI-1, Biopool, Umeå, Sweden)にて測定した。測定手技はプロトコル¹⁴⁾に従った。予め抗マウスPAI-1抗体がコーティングされたマイクロプレートの各穴に100 μlの洗浄液を満し、吸引洗浄した後に、測定サンプルおよびヒトPAI-1標準液(0-40 ng/ml)20 μlを各穴に加え、50 μlのペルオキシダーゼ標識抗ヒトPAI-1抗体を添加し、室温で2時間、振盪した。4回の洗浄後、発色基質液200 μlを加え室温で15分間振盪した。3 M硫酸50 μlを加え反応を停止した後、コナ・マイクロプレート・リーダー(MTP-120, コナ電気、ひたちなか)にて492 nmの吸光度を測定し、PAI-1標準曲線からPAI-1濃度を算定した。本キットでの測定感度は0.5 ng/mlで、測定内変動係数は1.9%、測定間変動係数は2.4%であった。

VII. RNA抽出とノザン・プロット解析

1. 全RNAの抽出

コンフルエントに達したHUVECを0.4% FBSと、100 ng/ml TNF-α、または10 ng/ml IL-1βを含む血管内皮細胞基礎培地にて、10 μMのトログリタゾンの存在下、非存在下で8時間培養した。上清除去後、培養細胞表面をPBSで3回洗浄後、ISOGEN(ニッポンジーン、富山)を使用して、イソチオシア酸グアニジン塩化セシウム法¹⁵⁾にて全RNAを抽出した。

2. ノザン・プロットング

20 μgのRNA試料を1.1 Mホルムアルデヒドを含む1.0%アガロースゲル上で電気泳動した。RNAをゲルからナイロン・フィルター(ハイボンDN⁺, Amersham, Buckinghamshire, UK)上へ転写し、紫外線固定を行った。

3. ハイブリダイゼーション

ヒトPAI-1 mRNA塩基配列のコード領域相補的オリゴヌクレオチド(24-mer: 5'-GCACCAGCCGTGTCAGCTGGTCCA-3')¹⁶⁾をプローブとして使用した。プローブは[γ-³²P] ATP(6,000 Ci/mmol; 1mCi=37MBq, Amersham)とDNA 5'末端標識キット(MEGALABEL, 宝酒造、京都)を用い、5'末端標識法にてプローブの標識を行った。42℃、4時間のプレハイブリダイゼーションを行った後、フィルター1 cm²あたり0.2 mlのHybrisol I (Oncor, Gaithersburg, USA)中で37℃、24時間、³²Pで標識され

た PAI-1 プローブとハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、フィルターは 70℃、10 分間の 20×SSC (1×SSC: 0.15 M 塩化ナトリウム, 0.015 M クエン酸ナトリウム) / 0.1% SDS による第 1 洗浄を行い、次に 37℃、10 分間の 0.2×SSC / 0.1% SDS による第 2 洗浄を行った。フィルターを 24 時間、フジ・イメージング・アナライザー・フィルム (富士フィルム, 浜松) に露出し、オートラジオグラフィーを行った後、バイオ・イメージング・アナライザー (FUJIX BAS1000, 富士フィルム) にて信号強度を読みとった。

VIII. 2-デオキシ-グルコース取り込みの検討

12 穴プラスチック培養プレート上で 1 穴あたり 2.0×10^4 個の細胞密度で播種し、コンフルエントに達した HUVEC を、糖取り込みの検討を行う 24 時間前から 0.4% FBS を含んだ血管内皮細胞基礎培地で培養した。HUVEC は 100 ng/ml TNF- α 存在下、非存在下にて 0.4% FBS と、1 または 10 μ M のトログリタゾンを含む血管内皮細胞基礎培地にて 24 時間培養した。HUVEC は PBS で 3 回洗浄後、5% CO₂ インキュベーター内で、37℃、30 分間、重炭酸クレブス・リンゲル液 (Krebs-Ringer bicarbonate, KRB) で静置した。その後、2-デオキシ- [1-³H] グルコース (Amersham), または 2-デオキシ-グルコース (Sigma, St. Louis, USA) を含む KRB と 5 分間培養後に培養上清を除去し、氷冷した 0.1 mM フロレチン (Sigma) を含んだ PBS 溶液で細胞層を 3 回洗浄した。細胞を 0.1% SDS で溶解した後、放射活性は液体シンチレーション・カウンターで測定した。また、細胞内蛋白量は蛋白定量キット (BCA protein assay reagent, PIERCE, Rockford, USA) で測定した。全ての測定値は細胞内蛋白量で補正し、TNF- α およびトログリタゾン非添加群の糖取り込み測定値を 100% とした際の % 比で表示した。

IX. 統計学的分析

測定値は平均±標準誤差で表示した。群間の平均値の有意差検定は対応のない t 検定で行った。p<0.05 を統計学的有意とみなした。

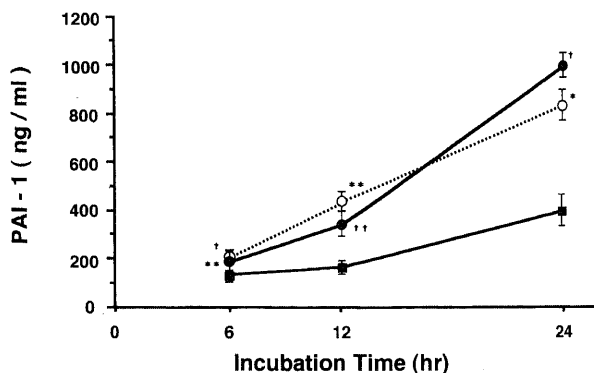


Fig. 2. Time course of TNF- α or IL-1 β -induced PAI-1 secretions from HUVECs. HUVECs were treated with 100 ng/ml TNF- α (●) or 10 ng/ml IL-1 β (○). Cytokine-induced PAI-1 secretions were increased in a time-dependent manner. Data are expressed as $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (n=3, *p<0.05, **p<0.01, †p<0.005, ††p<0.001 vs. control (■)).

成績

I. HUVEC からの PAI-1 産生に対するサイトカインの効果

100 ng/ml TNF- α , または 10 ng/ml IL-1 β 存在下で 0.4% FBS を含む血管内皮細胞基礎培地にて HUVEC を 24 時間培養した結果、TNF- α , IL-1 β いずれのサイトカインの添加においても、培地中の PAI-1 濃度は時間依存性に増加した (図 2)。

II. サイトカイン誘導 PAI-1 産生に対するトログリタゾンの抑制効果

PAI-1 産生に対するトログリタゾンの直接効果を検討するため、TNF- α (1, 10, 100 ng/ml), または IL-1 β (0.1, 1, 10 ng/ml) 存在下、非存在下にて 0.4% FBS と、1 または 10 μ M のトログ

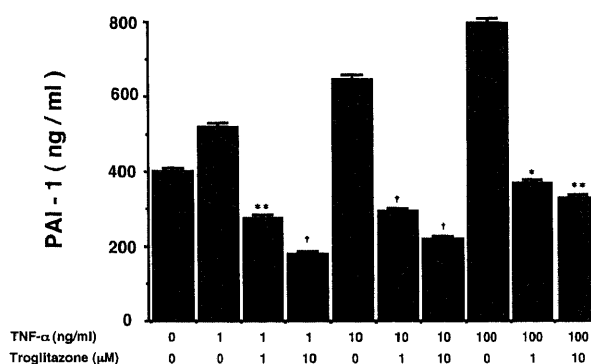


Fig. 3. Inhibitory effect of troglitazone on TNF- α -induced PAI-1 secretion. HUVECs were cultured with or without troglitazone (1 or 10 μ M) in the presence of TNF- α (1, 10, and 100 ng/ml) for 24 hr. 100 ng/ml TNF- α increased PAI-1 secretion to 1.99 ± 0.16 times the control value. Ten μ M troglitazone significantly inhibited TNF- α -induced PAI-1 secretion ($41.3 \pm 5.0\%$), and this inhibitory effect was dose-dependent. Data are expressed as $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (n=3, *p<0.01, **p<0.005, †p<0.001 vs. TNF- α alone).

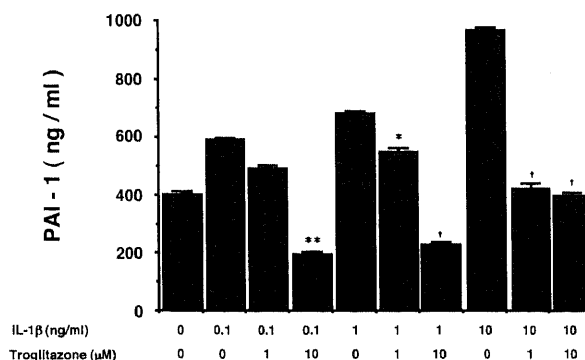


Fig. 4. Inhibitory effect of troglitazone on IL-1 β -induced PAI-1 secretion. HUVECs were cultured with or without troglitazone (1 or 10 μ M) in the presence of IL-1 β (0.1, 1, and 10 ng/ml) for 24 hr. Ten ng/ml IL-1 β increased PAI-1 secretion to 2.42 ± 0.42 times the control value. Ten μ M troglitazone significantly inhibited IL-1 β -induced PAI-1 secretion ($40.8 \pm 1.6\%$), and this inhibitory effect was dose-dependent. Data are expressed as $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (n=3, *p<0.05, **p<0.01, †p<0.005 vs. IL-1 β alone).

リタゾンを含む血管内皮細胞基礎培地にてHUVECを24時間培養した(図3, 4)。図3に示すように, TNF- α はHUVECからのPAI-1産生を容量依存性に増加させた。すなわち, TNF- α 非添加群のPAI-1産生量が 399.3 ± 71.7 ng/mlであるのに比して, 1 ng/ml TNF- α では 518.3 ± 29.9 ng/ml ($p=0.20$), 10 ng/ml TNF- α では 646.5 ± 16.8 ng/ml ($p<0.05$), 100 ng/ml TNF- α では 796.0 ± 64.1 ng/ml ($p<0.05$)に増加した。10 μ Mのトログリタゾンは1 ng/ml TNF- α 刺激下のPAI-1濃度を 34.3 ± 4.2 % ($p<0.001$), 10 ng/ml TNF- α 刺激下では 29.9 ± 2.2 % ($p<0.001$), 100 ng/ml TNF- α 刺激下では 41.3 ± 5.0 % ($p<0.005$)に抑制した。また, 図4に示すように, IL-1 β はHUVECからのPAI-1産生を容量依存性に増加させた。すなわち, IL-1 β 非添加群のPAI-1産生量が 399.3 ± 71.7 ng/mlであるのに比して, 0.1 ng/ml IL-1 β では 590.6 ± 46.7 ng/ml ($p=0.08$), 1 ng/ml IL-1 β では 680.0 ± 22.2 ng/ml ($p<0.05$), 10 ng/ml IL-1 β では 966.0 ± 51.8 ng/ml ($p<0.005$)に増加した。TNF- α と同様に, 10 μ Mのトログリタゾンは0.1 ng/ml IL-1 β 刺激によるPAI-1を 32.7 ± 0.0 % ($p<0.01$), 1 ng/ml IL-1 β 刺激下では 33.5 ± 0.3 % ($p<0.005$), 10 ng/ml IL-1 β 刺激下では 40.8 ± 1.6 % ($p<0.005$)に抑制した。一方, トリパン・ブルー排泄法にてトログリタゾンの細胞毒性の有無を検討したところ, トログリタゾン非添加群ならびに添加群間では差は認められず(トログリタゾン非添加群, 84.6 %; 10 μ Mトログリタゾン添加群, 87.1 %; $p=0.60$)。今回の検討に使用した濃度範囲では, トログリタゾンによる細胞毒性はないと考えられた。

III. トログリタゾン除去後のPAI-1産生の可逆性

PAI-1産生の可逆性を検討するため, トログリタゾン除去後, 24時間ごとのHUVEC培養上清中のPAI-1濃度を測定した(図5)。トログリタゾン除去後24時間まではトログリタゾンのPAI-1産生抑制効果が持続したが, 48時間以降はトログリタゾン非添加群と比較して, 有意な差はみられなかった。

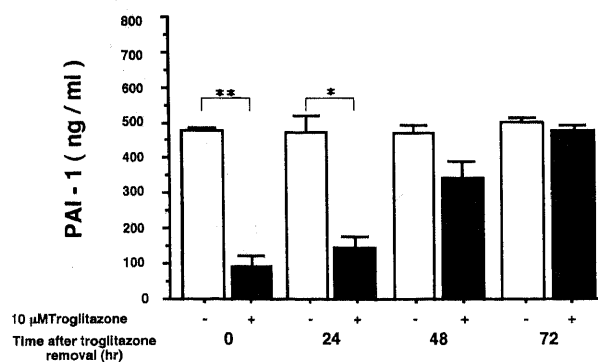


Fig. 5. Reversibility of TNF- α -induced PAI-1 secretion after troglitazone removal. TNF- α (100 ng/ml)-induced PAI-1 secretion from HUVECs cultured with the medium in the presence of 10 μ M troglitazone was decreased significantly compared with control 24 hr after troglitazone removal, but this inhibitory effect disappeared thereafter. Data are expressed as $\bar{x} \pm$ SEM ($n=3$, * $p<0.005$, ** $p<0.001$ vs. without troglitazone).

IV. HUVECにおけるサイトカイン誘導 PAI-1 mRNA 発現に対するトログリタゾンの抑制効果

100 ng/ml TNF- α , または10 ng/ml IL-1 β 添加によって, PAI-1 mRNA発現はコントロールに比較して, 明らかに増加した。一方, 10 μ MのトログリタゾンはTNF- α またはIL-1 β により誘導されたPAI-1 mRNAを抑制した(図6)。

V. HUVECにおける糖取り込みに対するトログリタゾンの影響

図7に示すように, 100 ng/ml TNF- α で前処置を行った際の糖取り込みの平均値は非添加群の 92.0 ± 10.0 % ($p=0.46$), TNF- α およびトログリタゾン同時前処置群の糖取り込みは, 非添加

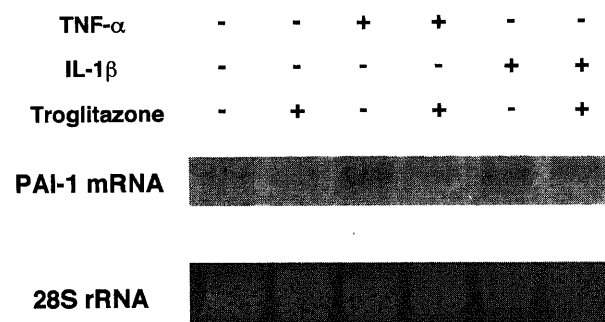


Fig. 6. Effects of troglitazone on cytokine-induced PAI-1 mRNA expression in HUVECs. HUVECs were cultured in the medium containing 0.4% FBS with or without 10 μ M troglitazone in the presence of 100 ng/ml TNF- α or 10 ng/ml IL-1 β for 8 hr. Total cellular RNA was extracted and electrophoresed, blotted, and hybridized with 32 P-labeled PAI-1 probe. Northern blot analysis showed that 10 μ M troglitazone inhibited TNF- α - and IL-1 β -induced PAI-1 mRNA expressions. 28S rRNA stained with ethidium bromide is presented at the below of this figure.

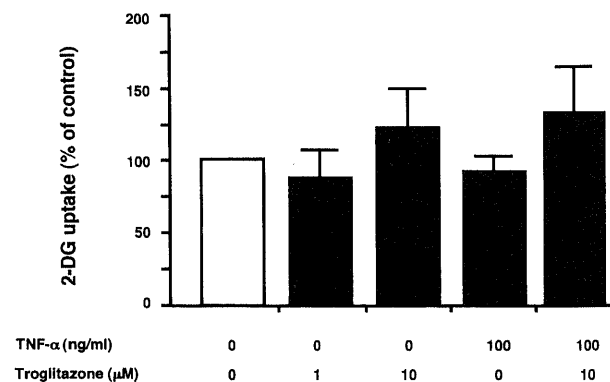


Fig. 7. Effects of troglitazone on 2-deoxy-glucose (2-DG) uptake in HUVECs. HUVECs were cultured in the medium containing 0.4% FBS with or without 10 μ M troglitazone in the presence of 100 ng/ml TNF- α , or with troglitazone alone (1 or 10 μ M) for 24 hr. Measurement of 2-deoxy-[1- 3 H] glucose uptake was performed as described in Methods. The 2-DG uptake in each group did not differ from the control. The 2-DG uptake obtained in cells pretreated without TNF- α and troglitazone was taken as 100%. Data are expressed as $\bar{x} \pm$ SEM ($n=6$).

群の $132.6 \pm 32.0\%$ ($p=0.25$)であり、トログリタゾン非添加時と比較して有意差は認められなかった。同様に、トログリタゾン単独前処置での糖取り込みについては、 $1 \mu\text{M}$ ならびに $10 \mu\text{M}$ トログリタゾン添加群は各々、非添加群の $86.3 \pm 19.4\%$ ($p=0.35$), $122.4 \pm 27.1\%$ ($p=0.39$)であり、非添加群と比較して有意差は認められなかった。一方、インスリン ($20 \mu\text{g/ml}$) 存在下でのHUVECにおける糖取り込みも検討したが、インスリン添加は糖取り込みに影響は与えなかった。

考 察

インスリン抵抗性はインスリン非依存型糖尿病の成因であるだけでなく、動脈硬化の危険因子となる高インスリン血症、高血圧、高脂血症、肥満といった疾患の病態の基礎を成していると考えられている。近年開発された、トログリタゾンに代表されるチアゾリジン系薬剤はこのインスリン抵抗性を改善し、耐糖能異常や脂質異常を改善する⁹⁾¹⁰⁾ことから、動脈硬化の形成、進展を間接的に抑制しうることが想定される。今回、HUVECを用い、動脈硬化の危険因子であるPAI-1へのトログリタゾンの影響を見ることで、動脈硬化に対する同剤の直接的効果を検討した。高血糖や高インスリン血症状態では、血漿PAI-1濃度が上昇する¹⁷⁾¹⁸⁾ことが知られているが、今回の検討においては、PAI-1誘導に関するインスリンや血糖による影響を除外するため、インスリンを含まない低血清濃度条件下でHUVECを培養し、サイトカインを添加した。図2に示すように、今までの報告¹⁹⁾²⁰⁾と同様、TNF- α とIL-1 β という二つの異なるサイトカインは時間依存性にHUVECからのPAI-1を誘導した。今回の検討では、PAI-1濃度の増加は24時間の培養中に継続してみられたことから、増加したPAI-1は細胞内の貯蔵プール由来ではなく、サイトカインによって誘導されたHUVEC内でのPAI-1産生増加を意味すると考えられた。また、図3、4に示すごとく、トログリタゾンは容量依存性にPAI-1産生を抑制する結果を得た。最近、Katoら²¹⁾は、著者と同様に、HUVECを用いてTNF- α によって誘導されたPAI-1発現をトログリタゾン、およびインスリン抵抗性改善薬の一つであるピオグリタゾンが抑制することを報告したが、その抑制機序は明らかにはされていない。著者はこのトログリタゾンによるPAI-1発現抑制が、同剤の細胞毒性による可能性を否定するため、色素排泄法による生細胞数、トログリタゾン除去後のPAI-1産生の可逆性、ならびにHUVECにおける糖取り込みに及ぼすトログリタゾンの効果の検討を行った。その結果、トログリタゾン添加によって、生細胞数に変化がみられないこと、トログリタゾン除去後のPAI-1産生に可逆性がみられること、ならびにHUVECにおける糖取り込みにトログリタゾンが影響を与えないことから、PAI-1産生の抑制は細胞毒性に伴うものではないと考えられた。

トログリタゾンの細胞の糖取り込みに対する影響については、現在までにVSMCや脂肪細胞を用いたいくつかの検討がみられる。Kiharaら²²⁾はトログリタゾンが大動脈VSMCでの糖取り込みと糖輸送担体 (glucose transporter, GLUT) 1の数を増加させることを報告した。Ohsumiら²³⁾はトログリタゾンがインスリン感受性を改善することによって、脂肪細胞における糖取り込みとGLUT 4の数が増加することを報告している。しかし、著者が調べた範囲内では、内皮細胞における糖取り込みに対するトログリタゾンの効果についての報告はなく、HUVECにおける今回の検討は初めての報告である。細胞種によりトロ

グリタゾンの糖取り込みに及ぼす効果が異なる機序として、主に発現しているGLUTが細胞種により異なること、ならびに内皮細胞での糖取り込みを調節しているGLUT 1²⁴⁾の発現が大動脈VSMCの場合と異なる可能性などが考えられるが、今後、HUVECにおいてもGLUT 1の発現に対してトログリタゾンがいかなる影響を及ぼすか、さらなる検討が必要と考えられた。

さらに著者は、トログリタゾンがHUVECからのPAI-1分泌だけでなく、サイトカインによって誘導されたPAI-1 mRNA発現も抑制することを示した。この結果はトログリタゾンが遺伝子発現レベルでPAI-1産生を抑制することを示唆する。トログリタゾンがサイトカインによって誘導されたPAI-1遺伝子発現を抑制する機序としては以下の二つの可能性が考えられる。一つは、転写因子を介した遺伝子転写を直接抑制する可能性である。TNF- α やリポポリサッカライド (lipopolysaccharides)²⁵⁾、TGF- β ²⁶⁾といったサイトカインが直接mRNAレベルでPAI-1産生を刺激することが報告されている。TNF- α とIL-1 β は内皮細胞の特異的受容体に結合後、転写因子アクチベーター・プロモーター-1 (activator promoter-1, AP-1) の合成や核転写因子 κB (nuclear factor-kappa B, NF- κB) の活性を介し遺伝子発現を誘導する²⁷⁾。一方、PAI-1発現は異なるシグナル経路を持ついくつかのサイトカインによる直接的なNF- κB の活性化を介して誘導される²⁸⁾。トログリタゾンに代表されるチアゾリジン系薬剤は、脂肪細胞の分化誘導促進作用を有するペルオキシソーム増殖型応答性レセプター γ (peroxisome proliferator activated receptor- γ , PPAR- γ) のリガンドであることが判明しているが²⁹⁾、このPPAR- γ の活性化によって、情報伝達・転写活性化因子群 (signal transducer and activator of transcription), NF- κB , AP-1の三つの転写因子が抑制されたという報告がされている³⁰⁾。PPAR- γ は主に脂肪細胞に発現しているが、その他の細胞での発現や役割については不明であった。しかし、最近、HUVECにおいてもPPAR- γ の発現が確認されており²¹⁾、トログリタゾンはHUVECにおいて、PPAR- γ を活性化し、転写因子、とくにNF- κB を抑制することによって、PAI-1産生を低下させる可能性が考えられる。

また、トログリタゾンがサイトカインによって誘導されたPAI-1遺伝子発現を抑制する別の機序としては、前転写段階でのシグナル経路の抑制があげられる。TNF- α とIL-1 β はマイトージェン活性化プロテインキナーゼ (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 経路を含むいくつかの共通経路を刺激し^{31)~35)}、PAI-1産生を増加させる可能性があると考えられている。一方、プロテインキナーゼC (protein kinase C, PKC) の賦活剤であるホルボール 12-ミリステート 13-アセテート (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) はPAI-1産生を刺激することが知られている³⁶⁾。著者はトログリタゾンがPMAによって誘導されたPAI-1産生に影響を及ぼすか否かを検討したところ、トログリタゾンはPMA刺激によって誘導されたHUVECからのPAI-1分泌、ならびにmRNA発現を抑制する結果を得た (未発表データ)。この結果からもトログリタゾンがサイトカイン受容体以降のシグナル経路の下流段階、とくにPKC またはPKC以降の下流のシグナルを抑制し、その結果としてPAI-1発現を抑制する機序も考えられる。血管細胞に対するトログリタゾンの直接作用がMAPK経路を介するという報告が散見され、高血糖による冠動脈のVSMCの遊走と増殖、ならびに細胞膜PKC活性の増加をトログリタゾンが抑制したという報告¹²⁾や、MAPKキ

ナーゼによる MAPK の活性化以降の下流を抑制することによって、トログリタゾンが塩基性繊維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor) やアンジオテンシンによって誘導された VSMC 増殖を抑制したという報告¹¹⁾がある。しかし、現時点ではトログリタゾンの作用機序については解明されていない点が多く、詳細な機序を明らかにするためにもさらなる検討が必要である。

今回の結果以外にも、チアゾリジン系薬剤の血管細胞に対する直接作用を示唆する報告が散見される。Yasunari ら¹²⁾はトログリタゾンが高血糖で誘導された冠動脈平滑筋細胞の増殖と遊走を抑制することを報告している。Low ら¹¹⁾はトログリタゾンがラット大動脈のバルーン障害モデルにおける血管内膜肥厚を抑制することを報告した。血管内皮細胞に関しては、Gralinski ら³⁷⁾は内皮細胞に対しピオグリタゾンとトログリタゾンが内皮細胞の増殖を抑制したと報告している。Yokoyama ら¹³⁾は、動脈硬化の形成過程において重要な役割を担うマクロファージや単球細胞の遊走活性を持つ MCP-1 の発現に対するトログリタゾンの影響を検討したところ、トログリタゾンがヒトメサンギウム細胞、および内皮細胞における MCP-1 発現を抑制することを見出し、同剤が腎硬化症や動脈硬化の発症、進展に対して予防効果を有する可能性があることを報告している。その他、マクロファージにおいて PPAR- γ を活性化することによって、誘導型 NO 合成酵素およびスカベンジャー受容体 A 発現の低下³⁰⁾や TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 といった炎症性サイトカインの産生を抑制する³⁸⁾という報告があり、チアゾリジン系薬剤は多様な抗動脈硬化作用を有すると考えられる。

今回、著者は HUVEC における PAI-1 発現をトログリタゾンが抑制することを示した。今回の結果からトログリタゾンは耐糖能異常やインスリン抵抗性、脂質異常を改善させることによって、間接的に動脈硬化を抑止する以外に、直接的に血管内皮細胞に作用して動脈硬化を抑制する可能性が示唆された。臨床的にも、トログリタゾン投与後、インスリン非依存型糖尿病患者において血漿 PAI-1 濃度が減少することが報告されており³⁹⁾、トログリタゾンによる血糖降下作用に伴う PAI-1 発現の低下に加え、内皮細胞由来の PAI-1 発現を直接抑制している可能性が考えられる。今回の検討から、PAI-1 発現低下という直接的動脈硬化抑制作用を持つトログリタゾンは、糖尿病患者における大血管症の予防に有用な薬剤であると考えられた。

結 論

HUVEC を用いて、PAI-1 産生に対するトログリタゾンの直接効果について検討し、以下の知見を得た

1. サイトカインによって誘導された HUVEC 培養上清中の PAI-1 をトログリタゾンが容量依存性に抑制した。

2. トログリタゾンはサイトカインによって誘導された PAI-1 mRNA を抑制した。

3. トログリタゾンの有無で色素排泄法による生細胞数に差異を認めなかったこと、トログリタゾン除去後の PAI-1 産生能の可逆性、およびトログリタゾン添加が HUVEC における糖取り込みに影響を与えなかったことから、トログリタゾンによる細胞毒性はないと考えられた。

4. 以上の結果より、トログリタゾンは HUVEC における PAI-1 産生を直接抑制することによって、動脈硬化の形成と進展を抑止しうる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師小林健一教授に深甚なる謝意を捧げます。また、終始直接の御指導いただきました永井幸広講師ならびに 篠 俊成博士に深謝致します。最後に本研究中大なる御援助を賜りました金沢大学医学部第一内科第一研究室の諸先生方に感謝の意を表します。

なお、本研究の要旨は第 41 回日本糖尿病学会年次学術集会 (1998 年、和歌山) および the 34th annual meeting of European Association for the Study of Diabetes (1998 年、Barcelona, Spain) において発表した。

文 献

- 1) Munro JM, Cortan RS. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* 58: 249-260, 1988
- 2) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809, 1993
- 3) Giugliano D, Paolisso G, Ceriello A. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19: 257-267, 1996
- 4) Engelberg H. Endothelium in health and disease. *Semin Thromb Hemost* 15: 178-183, 1989
- 5) Klagsbrun M, Edelman ER. Biological and biochemical properties of fibroblast growth factors: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 9: 269-278, 1989
- 6) Gray RP, Yudkin JS, Patterson DLH. Plasminogen activator inhibitor - a risk factor for myocardial infarction in diabetic subjects. *Br Heart J* 69: 228-232, 1993
- 7) Juhan-Vague I, Roul C, Alessi MC, Ardisson JP, Heim M, Vague P. Increased plasminogen activator inhibitor in non-insulin-dependent diabetic patients - relationship with plasma insulin. *Thromb Haemost* 61: 370-373, 1989
- 8) Juhan-Vague I, Alessi MC, Vague P. Increased plasma plasminogen activator inhibitor 1 levels. A possible link between insulin resistance and atherothrombosis. *Diabetologia* 34: 457-462, 1991
- 9) Mimura K, Umeda F, Hisamatsu S, Taniguchi S, Ono Y, Nakashima N, Kobayashi K, Masakado M, Sako Y, Nawata H. Effects of a new oral hypoglycaemic agent (CS-045) on metabolic abnormalities and insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabet Med* 11: 685-691, 1994
- 10) Suter SL, Nolan JJ, Wallance P, Gumbiner B, Olefsky JM. Metabolic effects of new oral hypoglycemic agent CS-045 in NIDDM subjects. *Diabetes Care* 15: 193-203, 1992
- 11) Low RE, Meehan WP, Xi X, Graf K, Wuthrich DA, Coats W, Faxon D, Hsueh WA. Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. *J Clin Invest* 98: 1897-1905, 1996
- 12) Yasunari K, Kohno M, Kano H, Yokokawa K, Minami M, Yoshikawa J. Mechanisms of action of troglitazone in the prevention of high glucose-induced migration and proliferation of cultured coronary smooth muscle cells. *Circ Res* 81: 953-962, 1997
- 13) Yokoyama M, Nagai Y, Yamashita H, Yoshizawa M, Hisada A, Kobayashi K. Inhibitory effect of TROGLITAZONE (CS-045) on cytokine-induced monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-

- 1) expression in human mesangial cells. *Diabetologia* 40: A434, 1997
- 14) Declerck PJ, Alessi MC, Verstreken M, Kruithof EK, Juhan-Vague I, Collen D. Measurement of plasminogen activator inhibitor 1 in biologic fluids with a murine monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* 71: 220-225, 1988
- 15) Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 16) Pannekoek H, Veerman H, Lambers H, Diergaarde P, Verweij CL, van Zonneveld A, van Mourik JA. Endothelial plasminogen activator inhibitor (PAI): a new member of the Serpin gene family. *EMBO J* 5: 2539-2544, 1986
- 17) Cagliero E, Roth T, Roy S, Maiello M, Lorenzi M. Expression of genes related to the extracellular matrix in human endothelial cells. *J Biol Chem* 266: 14244-14250, 1991
- 18) Nordt TK, Sawa H, Fujii S, Sobel BE. Induction of PAI-1 by proinsulin and insulin in vivo. *Circulation* 91: 764-770, 1995
- 19) Schleef RR, Bevilacqua MP, Sawdey M, Gimbrone MA, Loskutoff DJ. Cytokine activation of vascular endothelium. *J Biol Chem* 263: 5797-5803, 1988
- 20) van Hinsbergh VWM, Kooistra T, van den Berg EA, Princen HMG, Fiers W, Emeis JJ. Tumor necrosis factor increases the production of plasminogen activator inhibitor in human endothelial cells in vitro and in rats in vivo. *Blood* 72: 1467-1473, 1988
- 21) Kato K, Satoh H, Endo Y, Yamada D, Midorikawa S, Sato W, Mizuno K, Fujita T, Tsukamoto K, Watanabe T. Thiazolidines down-regulate plasminogen activator inhibitor type 1 expression in human vascular endothelial cells: a possible role for PPAR- γ in endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 258: 431-435, 1999
- 22) Kihara S, Ouchi N, Shinohara E, Tamura R, Yamashita S, Matsuzawa Y. Troglitazone enhances glucose uptake and inhibits mitogen-activated protein kinase in human aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 136: 163-168, 1998
- 23) Ohsumi J, Sakakibara S, Yamaguchi J, Miyadai K, Yoshioka S, Fujiwara T, Horikoshi H, Serizawa N. Troglitazone prevents the inhibitory effects of inflammatory cytokines on insulin-induced adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Endocrinology* 135: 2279-2282, 1994
- 24) Gaposchkin CG, Garcia-Diaz JF. Modulation of cultured brain and aortic endothelial cell glucose transport. *Biochim Biophys Acta* 1285: 255-266, 1996
- 25) Sawdey MS, Loskutoff DJ. Regulation of murine type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in vivo. *J Clin Invest* 88: 1346-1353, 1991
- 26) van den Berg EA, Sprengers ED, Jaye M, Burgess W, Maciag T, van Hinsbergh VWM. Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 mRNA in human endothelial cells. *Thromb Haemost* 60: 63-67, 1988
- 27) Osborn L, Kunkul S, Nabel GJ. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2336-2340, 1989
- 28) Ferran C, Millan MT, Csizmadia V, Cooper JT, Brostjan C, Bach FH, Winkler H. Inhibition of NF- κ B by pyrrolidine dithiocarbamate blocks endothelial cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 214: 212-223, 1995
- 29) Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma). *J Biol Chem* 270: 12953-12956, 1995
- 30) Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391: 79-82, 1998
- 31) Magnuson DK, Maier RV, Pohlman TH. Protein kinase C: potential pathway of endothelial cell activation by endotoxin, tumor necrosis factor, and interleukin-1. *Surgery* 106: 216-222, 1989
- 32) Ritchie AJ, Johnson DR, Ewenstein BM, Pober JS. Tumor necrosis factor induction of endothelial cell surface antigens is independent of protein kinase C activation or inactivation: studies with phorbol myristate acetate and staurosporine. *J Immunol* 146: 3056-3062, 1991
- 33) Bereta J, Bereta M, Cohen S, Cohen M. Studies on the role of protein kinases in TNF-mediated enhancement of murine tumor cell-endothelial cell interactions. *J Cell Biochem* 47: 62-78, 1991
- 34) Wertheimer SJ, Myers CL, Stratowa C, Wallance RW, Parks TP. Multiple regulatory mechanisms of ICAM-1 gene expressions in human endothelial cells. *J Cell Biol* 115: 453a, 1991
- 35) Schrlie PA, Pratta MA, Feeser WS, Tancula EJ, Arner EC. The effects of IL-1 on mitogen-activated protein kinases in rabbit articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 230: 573-577, 1997
- 36) Santell L, Levin EG. Cyclic AMP potentiates phorbol ester stimulation of tissue plasminogen activator release and inhibits secretion of plasminogen activator inhibitor-1 from human endothelial cells. *J Biol Chem* 263: 16802-16808, 1988
- 37) Granlinski MR, Rowse PE, Breider MA. Effects of troglitazone and pioglitazone on cytokine-mediated endothelial cell proliferation in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol* 31: 909-913, 1998
- 38) Jiang C, Tong AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibits production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391: 82-86, 1998
- 39) Fonseca VA, Reynolds T, Hemphill D, Randolph C, Wall J, Valiquet TR, Graveline J, Fink LM. Effect of troglitazone on fibrinolysis and activated coagulation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 12: 181-186, 1998

Troglitazone Inhibition of Cytokine-Induced Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1) Expression in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells Erika Nohara, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640-J. Jusen Med Soc., **108**, 467-474 (1999)

Key words plasminogen activator inhibitor type 1, troglitazone, endothelial cells, atherosclerosis

Abstract

Troglitazone, an insulin sensitizer, is known to improve glucose intolerance, insulin resistance, and dyslipidemia, so it was suspected that it might also inhibit the initiation and progression of atherosclerosis. Plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) plays an important role in the pathogenesis of atherosclerosis, and its circulatory level is elevated in patients with insulin resistance. The biosynthesis of PAI-1 in endothelial cells is stimulated by various inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- α or interleukin (IL)-1 β , which are released by monocytes/macrophages under oxidative stress. The purpose of this study was to investigate the direct effects of troglitazone on PAI-1 secretion by human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). HUVECs were cultured for 24 hr in media containing 0.4% fetal bovine serum, both with and without troglitazone (1 or 10 μ M), and in the presence or absence of TNF- α (1-100 ng/ml) or IL-1 β (0.1-10 ng/ml), and the PAI-1 content of each medium was then measured by the ELISA method. Twenty four hours after the start of incubation, the PAI-1 content in HUVECs treated with 100 ng/ml TNF- α and 10 ng/ml IL-1 β had significantly increased to 1.99 ± 0.16 and 2.42 ± 0.42 times the control value, respectively. 10 μ M troglitazone significantly inhibited TNF- α - and IL-1 β -induced PAI-1 secretions from HUVECs. The level of inhibition was between 29-41% with the varying concentrations (1-100 ng/ml) of TNF- α , and between 32-41% with the varying concentrations (0.1-10 ng/ml) of IL-1 β . Based on cell viability, the reversibility of PAI-1 production, and the lack of effect on glucose uptake, the inhibition of PAI-1 production by troglitazone is not thought to be due to cytotoxic effects on the HUVECs. Northern blot analysis further revealed that troglitazone inhibited the expression of PAI-1 mRNA. Overall, this suggests that troglitazone prevents the initiation and progression of atherosclerosis by direct inhibition of PAI-1 production by the HUVECs.